



(19)

(11) Publication number:

57197034 A

Generated Document.

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(21) Application number: 56081709

(51) Intl. Cl.: B01J 20/22 B01J 20/28 C07H 21/04 G01N 31/08

(22) Application date: 28.05.81

(30) Priority:	(71) Applicant: AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL
(43) Date of application publication: 03.12.82	(72) Inventor: HIROTSU TOSHIHIRO OGAWA HIDEOKI
(84) Designated contracting states:	(74) Representative:

**(54) PREPARATION OF IMMOBILIZED NUCLEIC ACID****(57) Abstract:**

**PURPOSE:** To immobilize and insolubilize nucleic acid, by a method wherein nucleic acid and a water-soluble high-molecular base material are mixed and irradiated with glow discharge plasma to insolubilize the surface layer part thereof by crosslinked gel formation.

**CONSTITUTION:** Nucleic acid is mixed with a water-soluble high molecular material as a matrix such as polyvinyl alcohol or gelatine and the mixture is irradiated with glow discharge plasma to insolubilize the surface layer part thereof by crosslinked gel formation. By utilizing this process, nucleic acid is confined into the matrix to prepare immobilized nucleic acid which is useful as a filler material of affinity chromatography and an adsorbent material in an antigen-antibody reaction.

COPYRIGHT: (C)1982,JPO&amp;Japio

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57—197034

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和57年(1982)12月3日

B 01 J 20/22

7203—4G

20/28

7203—4G

C 07 H 21/04

7252—4C

G 01 N 31/08

1 3 3

6514—2G

発明の数 1

審査請求 有

(全 6 頁)

⑭ 核酸固定化物の製造方法

目407—405

⑯ 特 願 昭56—81709

⑰ 発 明 者 小川秀興

⑱ 出 願 昭56(1981)5月28日

所沢市小手指町2丁目9—14

⑲ 発 明 者 広津敏博

⑳ 出 願 人 工業技術院長

茨城県筑波郡谷田部町松代4丁

㉑ 指定代理人 工業技術院繊維高分子材料研究所長

明 細 書

1. 発明の名称

核酸固定化物の製造方法

特許請求の範囲

- (1) 水溶性高分子素材に対してグロー放電プラズマを照射することによってこの表層部が架橋ゲル不溶化することを利用して、このマトリックス内に核酸を封じ込めることを特長とする固定化物の製造方法。
- (2) 核酸を封じ込めるマトリックスが、織布、不織布、繊維状物、ビーズ状物、粉体等の補強基材上で補強された形態を取る特許請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、核酸を固定、不溶化した形の材料の作成方法に関するものである。

本発明は、グロー放電プラズマを照射して、固

定化を達成することを特長としており、具体的には、固定化させる成分を汎用の高分子材料と混合しておき、高分子の部分がプラズマ照射によって架橋ゲル化することによって形成されるマトリックスの中に封じ込めることを特長とするものである。

アフィニティクロマトグラフィー法の一つとして、核酸等の生体分子を結合した形の吸着材料、あるいは、これらの成分分子を閉じ込めた形の吸着材料を用いる方法は、不溶化ないしは固定化技術の進歩と相まって、この数年来、飛躍的に発展し、特定の遺伝子や核酸等の分離などのために広く利用されるようになってきた。デオキシリボ核酸 (DNA) —アフィニティクロマトグラフィーは、これらの応用において有効なものの一つである。

DNA—アフィニティクロマトグラフィーにおいて、DNAを担体の中、あるいはその表層部に固定化ないしは結合する方法はすでにいくつかが報告されている。その中でよく用いられているも

のは、

- (1) セルロースや架橋ポリビニルアルコールなどのヒドロキシル基を有する担体を臭化シアン (BrCN) やエピクロルヒドリン等を用いて活性化し、こうしてつくり出された活性部位に対して核酸を共有結合的に結合せしめる方法、
  - (2) セルロースやセファデックスに対して、カルボジミドにより核酸末端のリン酸基を脱水反応を伴って共有結合的に結合せしめる方法、
  - (3) 核酸をアクリルアミドゲルの網の中に封じ込めた形で固定化する方法、
  - (4) 核酸を浸透させたセルロースをエタノール溶媒中に分散せしめ、かく拌しつつ光照射することによって結合せしめる方法、
  - (5) 核酸を浸透させたセルロースを凍結乾燥することを経て結合せしめる方法、
  - (6) 核酸をアガロースと混ぜ合わせて固める方法、
  - (7) カルボキシメチルセルロースなどのセルロース誘導体に核酸を結合させる方法、
- などである。

あって、実用的な意味からもこの点が長所となっている反面で、その製造条件によってはせっかく閉じ込めた核酸が担体のマトリックスにおける網目の大きさにしたがって考慮しなければならない問題がある。すなわち、小さすぎると吸着が実質的に生じることができないということも起こり得るし、逆に大きすぎると核酸が遊離してくるという結果となる。従って、核酸を封じ込める網目を適切に制御しておく必要がある。

さらに、これらいずれの方法においても固定化条件によっては、核酸の分子構造や1本鎖、2本鎖などといった形態に対する影響も考えられる。たとえば、製造の途中で核酸の形態に変化が生じて、あるいはまたその固定化物の使用条件によっては吸着における特異性が喪失したり、また場合によってはその吸着能力が全くなかったりといったことが生じる危険も考えられる。したがって、このような不都合さを極力避けるためには、どのような条件下でそれを使用するかということを考慮に入れる必要がある。更にその為にはどのような

これらそれぞれの方法は、作成の際の容易さの程度、固定化の強度、吸着される成分とのアフィニティの程度等に差があり、したがってそれらの結果として長所と短所とを合せて有しているものである。たとえば、上記方法のうち、共有結合を介して核酸を担体に固定化するやり方においては、その結合力が強いためにそれを実際に使用する際にも核酸が遊離しないしは脱離するといったことが容易には起り難い反面、核酸が結合している結合点が担体上の表面に限られるために結合量が少なく、したがってアフィニティクロマト用カラムや吸着材として用いる場合には、効率性に劣るといったことなどが考えられる。また、このような化学反応により試料を作成する場合には、反応条件がかなり強烈であるために、核酸自体の構造上の破壊なども考えられる。

一方、これに対して、(3)、(5)、(6)などの担体内に核酸を閉じ込めて固定化する方法は、もちろんそれぞれにおいて若干の差異はあるものの、一般的には、たとえば製造法的に比較的容易な方法で

な方法で核酸を固定して不溶化するのか、またどのような条件下でそれを使用するのか十分に検討しなければならない。

本発明は、以上のような諸点を考慮に入れて良好な種々の性能を有する核酸固定化材料を得るべく鋭意努力した結果到達したものである。

本発明における一般的な手順は以下のとおりである。

1. 核酸とマトリックスとなる水溶性高分子との混合物の水溶液を調製する。
2. 調製した粘稠な均一混合溶液に織布、不織布、繊維状物等の補強基材を浸漬させてこの上に薄く塗布し、乾燥して混合物からなる被膜を形成せしめる。
3. 乾燥した被膜処理試料をグロー放電プラズマで照射処理して高分子被膜部の架橋不溶化を図り、これによって核酸を固定化する。

核酸の不溶化のためのマトリックスとなる高分子の化学構造や分子量等により、また製造された固定化試料を用いる目的によってそれぞれの段階

における処方は適宜修飾することが出来る。核酸成分を保持するマトリックスとなる原料高分子としては、これら双方の成分が水系において混合溶液として均一となる必要があり、このような条件が最小限満たされる高分子であればよろしい。このための水溶性樹脂としては、たとえばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール等、及びこれらの各成分単量体とその他の単量体、たとえばアクリロニトリル、メタクリロニトリル、<sup>2</sup>アクリル酸エステル、メタクリル酸エステル等との共重合体、あるいはゼラチン、寒天等の天然高分子などがある。

グロー放電ガスプラズマにより高分子の表面を照射処理することによって生成する架橋層は極めて薄い。したがって脆弱な場合が多く、これを直接固定化のために用いるには機械的強度が乏しい。実際の使用に際してはこれをそのまま用いるのではなく何らかの形で補強する必要がある。この場合の補強材としては形状的にはガーゼや布巾等の織布、ろ紙等の不織布、脱脂綿や炭素繊維等の織

物、活性炭、シリカゲル、アルミナ等の粒状物<sup>粉</sup>ないしは粒状物がある。材質の面から見ると、核酸とマトリックス高分子の混合物が補強材の材質中に浸透して出来るだけからみ合うような形で層が形成されるのが望ましい。この意味からはガーゼや綿糸などが好ましい材質であり、とりわけこれらの素材は汎用なものであり安価であるというメリットをはじめとして、実際の製造工程や使用の際に処理が容易で種々の方面への応用が可能であるなどといった特長がある。ただし、本発明における固定化物として用いることの出来る素材がこれらに限定されるものではないことは言うまでもなく、たとえばナイロン、ポリエステル、アクリルなどの合成繊維、絹、麻、羊毛などの天然繊維、さらに炭素繊維、ガラスファイバーなども挙げることができる。

マトリックスとなる高分子と混合した核酸が溶解、脱離してしまうことを防いで不溶化を図る必要があるが、本発明においてはこのプロセスをグロー放電プラズマの照射によって高分子セグメン

ト間で架橋反応を行わしめて達成したことが特長である。周知のとおり数torr以下の低圧のもとでたとえば13.56MHzのラジオ波等の高周波を共振することによってグロー放電プラズマを発生せしめることが出来る。この例で示されるようなプラズマとは、高度に分離しており、しかも電気的に中性で平衡した状態をいう。すなわち原子がガス状で電離し、電子をはぎ取られた原子核が裸のまま動き回っている状態である。本発明において利用しているプラズマは、いわゆる低温プラズマであって、低圧低密度下で原子がラジカルやイオン、電子として混成された状態で存在しているものである。このプラズマ状態下では温度上昇は激しくなく、したがってこの低温プラズマはとくに高分子関連物質の処理において処理温度が融解点やガラス転移点を越すことによる形態上の変化、およびそれによる性質の変化を抑制することが出来るという利点がある。また、プラズマの浸透力は極めて小さく、処理される物質においてその作用力はごく薄い表面層に限定される。このために

物質のバルクな性質を保持した状態で表面部のみの変更が図れるという利点がある。

低温プラズマを利用した材料の表面処理には大きく分けて2つの方向がある。すなわち、

(1) 有機モノマーの活性化を経由したプラズマ重合による薄膜の製造、及びこの薄膜によるコーティング、

(2) 無機系ガス等からの非重合性ガスプラズマ照射による表面エッチング、及びプラズマ表面処理、である。本発明におけるプラズマ利用の目的は核酸分子の基材内への封じ込めというところであり、したがってこれは(1)のプラズマ重合薄膜の形成を伴ったコーティング処理によっても可能となるけれども、この場合には、たとえば水系溶媒中等において使用するコーティングした部分がハク離してしまうことがあり不都合なことが多い。これに対して(2)の非重合性プラズマ照射による表面処理ではそのようなトラブルは無く、より好ましいといえることが出来る。非重合性ガスプラズマ中に生じているラジカル、イオン、電子等の活性種によ

る衝突、或いはプラズマ中で派生的に生じている低波長域の紫外線等の作用によって、高分子材料表面における分子鎖上で水素脱離を伴って架橋が生じゲル化する。したがって、もとの未処理の高分子が溶解するような溶媒に対しても不溶化の傾向を示すようになる。本発明はこの現象を利用して核酸が混合されている水溶性高分子の不溶化を図り、これによって固定化を達成しようとするものである。ここで非重合性ガスプラズマの照射による架橋ゲル化の効果が生じてくるのは極く表面の部分に限定されるので、補強基材に核酸-水溶性高分子の混合溶液を塗布して覆層された形の試料を作成するに際してこの付着された層の厚さが余り厚すぎることがなく、プラズマ照射による架橋の形成が可能な数ミクロン以下であることが望ましい。ただし、処理の効果は混合した高分子成分の種類およびそれと補強基材との組合せにも依存しており、また吸着等の性能は試料内の核酸の量によっても影響を受けることになるので、これらについても十分に考慮しておく必要がある。ま

種類が常に一定しており、これを抗原-抗体反応といっている。

本発明の方法にしたがって作成した試料は、この抗原抗体反応を利用し、たとえば抗DNA抗体を吸着させて除去するための材料として有効である。生体内の結合組織に広範な炎症性の変化とフィブリノイド変性をきたす一群の病気である膠原病の一つにDNAに対する抗体が発生する例がある。この抗体はDNAと抗原-抗体反応を引き起こし、これによって生成したコンプレックスは、たとえば腎臓障害の原因となつてとくに20~30才の女性がかかる難病の一つとなっている。この疾病に対してはステロイド系の薬物等を投与する措置などが取られているが、これらも根本的な治癒をもたらすことはなく、有効な方法が見出されていないというのが現状である。しかしながら、もしこの異常な状態で発生している抗DNA抗体を何らかのやり方によって選択的に取り除くことが出来るならば完全な治療法となることが期待される。

た核酸を閉じ込める高分子マトリックスの網目の大きさの具合によって有効に核酸の封じ込めが出来る場合とそうでない場合が生じてくることになるので、プラズマ照射の条件の制御を十分に行う必要がある。

本発明に従って作成した試料は、たとえばアフィニティクロマトグラフィーにおけるカラム充填物や抗原-抗体反応を利用した吸着材としての応用が考えられる。

生体にとっての異物が体内に侵入した場合、細胞が刺激されて抗体を産出させる原因となった物質を抗原といっている。この2つの物質は鍵と鍵穴のように特異的に対応しているが、これは生物の自己識別という根本作用と考えられている。抗原はタンパクまたは多糖類であることが多く、細菌が体内で抗体を生ずるのも主として菌体タンパクが抗原ウイルスとなるからである。抗原を持つ菌、ウイルス、またはその抽出液と抗体を含む血清とを試験管内で混ぜ合わせると凝集反応や溶菌反応が生じる。このとき抗原に対する抗体はその

本発明の方法にしたがって作成したDNA-固定化材料について、実際の患者から採取した血清中の抗DNA抗体を吸着する性能を調べた。その結果、この材料が極めて選択性のよい抗体吸着能のあることが判明した。

吸着性能の評価は、抗DNA抗体価高値の患者の血清に固定化材料を一定時間浸漬して、そのあとの血清中の抗体価の減少を調べることにやって行った。すなわち、あらかじめ抗体価を検査しておいた血清中に一定重量のDNA-固定化材料を接触せしめ、37℃で一定時間インキューベートしたあと残存血清中の抗体価を間接血球凝集法によって測定し、これによって見られる抗体の減少の度合いを抗体吸着性能の指標とした。この処方及び吸着の効果については実施例、参考例によって具体的に示したとおりである。ここで固定化処理材料が有効に抗DNA抗体の吸着を生じていることは、未処理の材料における吸着の結果との比較からも明らかである。また、本発明にしたがって作成した材料は、アフィニティクロマトグラフ

ィー用としてすでに市販されているDNA固定化セルロースパウダーと比較してもDNAの結合力、すなわち固定化力において勝れている。たとえば、水洗のあと血清中に浸漬して、その結果脱離してくるDNAの量を測定した結果、市販DNA固定化セルロースパウダーではかなり多いのに対し、本発明による固定化材料ではその脱離量が抑えることが出来るところに特長がある。

本発明にしたがって作成したDNA固定化物は、実際にこれを生体系で用いる場合には、血清中の他の成分や因子に対する吸着や破壊等の影響がないことが必要である。このためにアルブミン、グロブリン等の成分の濃度、およびpHの変化を調べた。その結果、これらにはほとんど影響はなく、抗DNA抗体に対する選択的な吸着性のあることが認められた。

実施例1 市販の鮭精液製デオキシリボヌクレイン酸(DNA)0.25gとポリビニルアルコール(PVA, 重合度500)5.0gとを蒸留水50ml中にて混合する。均一な溶解を図るために、

の放電圧にて発生せしめてプラズマ処理を行った。試料ガーゼ布の表側を5分間、また同様の条件下で裏側を5分間照射処理した。裏側の処理の際には、あらかじめ真空にひいて脱気のために要する時間はかなり短縮され、数分間で十分であった。

実施例2 実施例1で作成したDNA-PVA混合物水溶液を刷毛によりろ紙に薄くかつまんべんなく塗った。これを室温のもとで風乾したあと実施例1とはほぼ同じようなやり方によって $N_2$ ガスプラズマ処理を施した。塗布部分のゲル不溶化が認められた。水系の溶媒中においては基材のろ紙自体が長時間の浸漬や機械的なかく拌等の作用によって破壊を受けることがあるので注意を要するが、これはペーパークロマト原理を応用した吸着分離材として適している。

実施例3 鮭精液製DNA0.50gとPVA5.0gとを混合してこれを50mlの蒸留水に溶解せしめる。この混合水溶液10ml中に医療用ガーゼを浸漬し、このあと軽く絞って過剰の水溶液を除いて風乾した。これによってガーゼ1.0g当り

マグネチックスターを用いて室温(22℃)のもとで緩やかにかく拌した。こうして粘稠な混合物溶液を得ることが出来た。

この混合物の水溶液10ml中に、洗浄のあと乾燥した医療用ガーゼ布を15cm×15cmに裁断したものを浸漬し、室温にてしばらく放置する。これを取り出して軽くしぼって余分の水溶液を除いたあと風乾する。このガーゼ布1枚当り0.50g~0.60gの混合物の付着が認められた。

処理すべき試料をアフターグロー部分を利用するプラズマ処理装置の内筒型反応管(内径4.4cm、長さ40cm)内に設置し、これを真空ラインへ直結して真空排気を行う。この場合十分な排気が完了するにはある程度の時間を要し、試料内に拡散し残留している空気や水分を脱離して $10^{-2}$  torr以下の高真空に達するには15~20分間が必要であった。この十分な排気を行ったあと、微調整用ニードルバルブに $N_2$ ガスをガス圧 $60 \times 10^{-3}$  torrとなるように導入し、13.56 MHzの高周波グロー放電プラズマを40ワット

0.14~0.16gの混合物を付着せしめることが出来た。こうして調製した試料を、実施例1と同様の方法で $N_2$ ガスプラズマ処理してDNA固定化材料を作成した。

実施例4 実施例3にしたがって調製した1:10 DNA-PVA混合水溶液の塗布処理を行ったガーゼ布を $50 \times 10^{-3}$  torrのヘリウムガスのもと、30ワットの放電圧で表裏それぞれ5分間ずつ合計10分間のプラズマ照射処理を行ないDNA固定化試料を作成した。

参考例1 実施例1により作成した試料10mlgを取り、これを患者から採取した血清0.5mlに浸漬して37℃でインキューベートした。患者のものと血清は、320倍量希釈下まで血球凝集反応が認められるのに対して、DNA固定化試料で吸着処理を施すと30分間、5分間いずれの処理時間のときでも40倍量の希釈で反応は認められなくなった。すなわちこのことは血清中に存在した抗体が吸着によって $\frac{1}{8}$ に減少していることを示している。

一方、未処理のままの医療用ガーゼ布で浸漬処理を行った場合、5分間のインキューベートでは抗体価には全く変化はなく、これを30分間に延長した場合にも実質的に抗体を吸着する能力は認められなかった。

比較例1 アフィニティクロマトグラフ用として市販されているDNA固定化セルロースパウダーについて、参考例における同様の方法によって抗DNA抗体の吸着<sup>性</sup>能をしらべた。この試料は、それぞれ未変性2重鎖および変性1重鎖DNAをそれぞれ結合したもので、それぞれ0.7-1.1 mg/ml, 0.3-0.6 mg/mlのDNAを含有している。これらは抗体の吸着性能にかなりの差があり、前者が、実施例1のガーゼ上に処理した試料にほぼ等しい程度の抗体吸着性を示すのに対して、後者の変性DNA固定化試料では性能的にかなり劣り、抗体価は約 $\frac{1}{2}$ まで減少した程度であった。